

抗酸菌検査施設に対する結核菌薬剤感受性試験 外部精度評価

御手洗 聡

※日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

要旨：〔目的〕日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会は検査センターおよび病院検査室を対象として薬剤感受性試験外部精度評価を施行した。〔方法〕薬剤感受性試験を実施している23の検査センターおよび25の病院検査室に耐性既知の結核菌20株を送付し、各施設で感受性試験を実施し、結果を標準判定と比較した。〔結果〕参加施設の検査精度は、INH・RFPで感度・特異度が平均95%を超えており、すべての薬剤で一致率平均が90%を超えていた。しかし、検査センターではINHの感度・特異度・一致率・再現性のすべてが100%であったのに対し、病院検査室では感度90%以下の施設が2施設（8%）認められた。同様にRFPに関しては感度が90%を下回る施設が検査センターで1施設（4.3%）、病院検査室で3施設（12%）認められた。2003年度に精度改善のため現地での調査・検討を行った2施設では、いずれも今回精度の改善を認めた。〔考察〕病院検査室間の結果のばらつきは検査センターに比べて大きく、同じ範囲内であっても病院検査室の検査精度は検査センターに比べて低い傾向にあった。また、外部精度評価に基づく検査法の改善は精度の向上に有効であった。

キーワード：結核，薬剤感受性試験，検査センター，病院検査室，外部精度評価

はじめに

世界では毎年900万人の結核患者が発生し、約200万人が死亡している。世界的な服薬確認（DOTS）戦略の拡大により、新規患者の発見率および治療成功率は上昇しており、結核の問題は改善しているように思われる。結核治療の基本は定型化された多剤併用療法であり、ほとんどの新規患者に対して有効であるが、脱落あるいは再発例では抗結核薬に対する耐性を示す株が少なくない。特に多剤耐性結核はきわめて治療困難であり、徐々に患者が集積することによって問題は拡大の傾向にある。世界保健機関（World Health Organization: WHO）ではこれに対処するためDOTS-plusと呼ばれる二次抗結核薬での耐性結核治療プログラムを推進している¹⁾。

多剤耐性を含む薬剤耐性菌を確定するためには感受性試験が必須である。結核菌の薬剤感受性試験は、通常ある一定の濃度の薬剤に対する結核菌の耐性率をみる（比

率法）ものであるが、結核菌の特性や培地の性質によって必ずしも安定した結果が得られるとは限らない。従って、内部精度管理および外部精度評価（External Quality Assessment: EQA）を実施して検査の精度を確保する必要がある。WHOと国際結核肺疾患予防連合（International Union against Tuberculosis and Lung Diseases: IUATLD）は1994年から世界の薬剤耐性結核サーベイランスを実施しているが、これに先立って世界中の抗酸菌検査施設から20数カ所をSupra-National Reference Laboratory（SRL）として指定し、WHO/IUATLDのセンターから菌株を配付し、各施設の薬剤感受性試験の結果を比較して精度を評価している²⁾³⁾。日本では著者らの所属する結核予防会結核研究所がSRLの認定を受けている。

日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会では、WHO/IUATLDの方法に準じて2003年に検査センターを対象とした薬剤感受性試験の外部精度評価を実施した。この外部精度評価は検査センター間の結果にばらつきがある

ことを示し、精度の低い施設の検出に有効であった。今回の研究では、対象を検査センターのみならず一般の病院検査室にも拡大し、その検査精度を評価することを目的とした。また、2003年に外部精度評価を実施した施設の精度維持と検査能力の改善について、外部精度評価が有効であったかを評価することも目的として研究を実施した。

対象と方法

(1) 参加施設

2003年度に厚生労働科学研究補助金、新興・再興感染症研究事業森班にて実施した全国抗酸菌検査施設へのアンケート調査をもとに⁴⁾、病院検査室および検査センターについて、薬剤感受性試験の年間実施件数の上位各30施設を選定し、それぞれに抗酸菌検査法検討委員会委員長および結核病学会理事長の連名で本調査への参加を依頼し、これを諾とした施設に対して被験菌株を送付した。最終的に検査センター26施設、病院検査室26施設、保健所検査室1施設から参加への同意を取得した。

(2) 被験結核菌株

被験結核菌株を2%小川培地上(8mlポリスチレンチューブ)に発育した状態で送付した。今回送付した菌株はSRL Network (SRLN)で1994年から2002年までに実施された薬剤感受性試験精度管理プログラムに使用された約200の結核菌株から、SRLN内部での判定一致率の高い株(基本的に80%以上)を選び、各薬剤に対する被験菌群の耐性率が50%程度となるように組み合わせた。こうして選定した10株を再現性の評価のためそれぞれ2株ずつに複製した計20株を被験菌株とした。最終的にisoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM) および ethambutol (EB) のセット内の耐性率はそれぞれ60%, 60%, 60%, 40%となった。参加各施設に配付した検体には、一検体ずつ異なる番号を割り振り、すべての結果はこの番号によって分類した。菌株の中には多剤耐性を含む薬剤耐性株が含まれているため、研究参加を依頼した時点で薬剤感受性試験実施時の安全キャビネットの使用を確認し、取り扱いについては十分なる注意を喚起した。

(3) 試験薬剤

試験は、SRLNの方式に従い、安定した結果が期待できるINH, RFP, SMおよびEBの一次抗結核薬4剤とした。

(4) 薬剤感受性試験方法

基本的に各施設で日常実施している方法で感受性試験を実施した。菌株と同時に調査用紙を配付し、接種菌液の調製法についても調査した。それぞれの菌株の薬剤感受性試験の結果は、結核菌検査指針に基づき、比率法の

場合は1%をcritical proportionとして「耐性」あるいは「感受性」のいずれかとして判定した。BACTEC MGIT 960(日本ベクトンディッキンソン)や最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration: MIC)を感受性試験として利用している場合は、それぞれの方法に従って耐性か感受性かを判定することとした。報告用紙に記入する際は、感受性にはS、耐性にはRを用いて表記した。

(5) 結果の解析

SRLNでの精度管理の方法に従って、SRLNの大多数の施設(70%以上)で一致した結果をもってその菌の示す耐性・感受性の標準判定とした⁵⁾。今回使用した菌株はすべてSRLNで80%以上の一致率を示した株である。各施設から送付された結果については「感度」「特異度」「一致率」「再現性」および判断の一致度を図るためkappa coefficient(κ 指数)を計算し評価した。感度とは、SRLNで耐性と判定した株を正しく耐性と判定する割合であり、特異度とは同様にSRLNで感受性とした株を正しく感受性と判定する割合である。一致率はSRLNとの判定の一致(耐性および感受性)の割合であり、再現性は各同一菌株ペアにおける判定結果の一致率を示す。また、解析結果についてはそれぞれの施設に通知するが、通知先の施設以外の施設名は匿名化し、個々の施設が特定されないよう配慮した。

結 果

薬剤感受性試験EQAに参加した53施設のうち、最終的に検査センター24施設、病院検査室24施設、保健所検査室1施設(以降、便宜上病院検査室に分類)から結果の報告を受けた。なお、1つの施設にて送付した菌株のうち1株が発育しなかったため、その施設については19株の結果をもって解析を行った。

結果を受領した49施設では、23施設がビットスペクトル-SR、16施設がウエルバックS、5施設がMGIT、3施設が1%小川培地(普通法)、2施設がBrothMIC MTB-I(極東製薬)を感受性試験に使用していた。なお、3施設については複数の方法(ウエルバックS+MGIT, MGIT+BrothMIC MTB-I およびウエルバックS+BrothMIC MTB-I)による報告があったが、全施設を対象とした感度・特異度等の解析にはその施設で日常多く実施している方法による結果を使用した。また、1つの検査センターにて5株しか試験を行わなかったとの報告があり、これは今回の感受性結果解析から除外したため、全体で48施設での結果解析となった。

(1) 検査法および菌液調製法

今回Panel testingを実施した施設では、47施設で比率法が採用されており、2施設のみMICによる感受性試験

を採用していた。接種菌液の調製法についてみると、32施設が固体培地に発育したコロニーから菌液を調製し、一度液体培地で増菌してからそれぞれの感受性試験培地に接種していた。13施設は固体培地上のコロニーをガラスビーズ等で分散させ、懸濁液から感受性試験培地への接種を行っていた。残る4施設は液体培地にて分離を行い、これを感受性試験培地に接種していた。接種時の濁度調製法をみると、目視にて McFarland 0.5～1.0 に調製する場合は24施設、比濁計を用いて OD 0.1～0.2 に調製する場合は16施設、それら両方を実施しているのが4施設あり、培地から採取した菌量にある一定量と仮定して、濁度そのものは確認しない施設が5施設みられた。

菌液を目視調製する施設と比濁計を用いている施設の間に SM の感度について有意差が認められた。目視調製施設の感度平均は91.3%であり、比濁計使用施設群での感度平均81.7%に対して有意に高かった。

(2) 各薬剤に対する感受性試験の成績

薬剤別の感受性試験結果では (Table 1), INH の感度の平均が100%, 特異度の平均が99.0% (62.5～100), 一致率の平均が99.6% (85.0～100), 再現性の平均が99.6%

(90～100) であった。一致性を κ 指数でみると0.991であり、ほぼ完全な一致を示していた。

RFP の感度の平均は97.7% (83.3～100), 特異度の平均は100%, 一致率の平均は98.6% (90～100), 再現性の平均は99.0% (90～100) であった。 κ 指数は0.972であった。

SM では感度の平均が87.5% (66.7～100), 特異度の平均が99.0% (87.5～100), 一致率の平均が92.1% (80～100), 再現性の平均が97.5% (70～100) であった。 κ 指数は0.84であり、今回の試験薬剤では最も低い値であった。

EB では感度の平均が99.5% (75.0～100), 特異度の平均が97.9% (75.0～100), 一致率の平均が98.5% (85.0～100), 再現性の平均が97.9% (70～100), κ 指数0.97であった。

(3) 菌株ごとの判定一致率

個々の菌株について、SRLNでの判定結果と、今回参加施設との判定の差違を耐性判定の数で示した (Table 2)。今回の Panel testing では IX-5655 株について参加施設で RFP および SM 感受性と判定される場合が多く、RFP に関する一致率 (=SRLN と一致した結果を示した

Table 1 Drug-specific indicators of performance by laboratories according to the method (kit) used for DST

Indicator	Percentage of each indicator (range)					
	Bitspectre-SR n=23	Welpack S n=15	MGIT n=5	1% Ogawa n=3	BrothMIC MTB-I n=2	All n=48
INH						
Sensitivity	100	100	100	100	100	100
Specificity	99.5 (87.5-100)	100	92.5 (62.5-100)	100	100	99.0 (62.5-100)
Efficiency	99.8 (95.0-100)	100	97.0 (85.0-100)	100	100	99.6 (85.0-100)
Reproducibility	99.6 (90-100)	100	98.0 (90-100)	100	100	99.6 (90-100)
kappa*	0.995	1	0.936	1	1	0.991
RFP						
Sensitivity	96.4 (83.3-100)	99.4 (91.7-100)	96.7 (83.3-100)	100	100	97.7 (83.3-100)
Specificity	100	100	100	100	100	100
Efficiency	97.8 (90.0-100)	99.7 (95.0-100)	98.0 (90.0-100)	100	100	98.6 (90.0-100)
Reproducibility	98.3 (90-100)	99.3 (90-100)	100	100	100	99.0 (90-100)
kappa	0.955	0.993	0.958	1	1	0.972
SM						
Sensitivity	84.4 (66.7-100)	95.6 (75.0-100)	86.7 (66.7-100)	83.3 (66.7-100)	70.8 (66.7-75.0)	87.5 (66.7-100)
Specificity	98.9 (87.5-100)	100	95.0 (87.5-100)	100	100	99.0 (87.5-100)
Efficiency	90.2 (80.0-100)	97.3 (85.0-100)	89.9 (80.0-95.0)	90.0 (80.0-100)	82.5 (80.0-85.5)	92.1 (80.0-100)
Reproducibility	97.0 (70-100)	98.7 (90-100)	96.0 (90-100)	100	95.0 (90.0-100)	97.5 (70-100)
kappa	0.803	0.945	0.795	0.8	0.66	0.84
EB						
Sensitivity	100	100	95.0 (75.0-100)	100	100	99.5 (75.0-100)
Specificity	97.1 (75.0-100)	100	98.3 (91.7-100)	100	87.5 (75.0-100)	97.9 (75.0-100)
Efficiency	98.3 (85.0-100)	100	97.0 (90.0-100)	100	92.5 (85.0-100)	98.5 (85.0-100)
Reproducibility	97.4 (70.0-100)	100	94.0 (80.0-100)	100	95.0 (90.0-100)	97.9 (70-100)
kappa	0.964	1	0.936	1	0.848	0.97

*kappa: kappa coefficient

INH: isoniazid RFP: rifampicin SM: streptomycin EB: ethambutol

Table 2 Number of laboratories (Total = 48) which produced resistant result to each strain assigned

Strain	ID	INH		RFP		SM		EB	
		JUD	Labs.	JUD	Labs.	JUD	Labs.	JUD	Labs.
X-8249	1a	S (100)*	1	S (100)	0	R (90)	22	S (100)	0
	1b		2		0		25		1
X-7691	2a	R (100)	48	R (95)	48	S (81)	2	R (90)	47
	2b		48		48		2		48
X-128	3a	S (100)	1	R (100)	48	R (95)	48	S (100)	1
	3b		0		48		48		1
IX-5655	4a	R (100)	48	R (100)	41	R (90)	37	S (100)	0
	4b		48		42		37		0
VIII-475	5a	R (95)	47	R (95)	47	R (95)	47	R (95)	47
	5b		48		48		48		48
VIII-2890	6a	S (100)	0	S (100)	0	S (100)	0	S (100)	0
	6b		0		0		0		0
VII-1029	7a	R (100)	48	R (95)	48	R (100)	47	R (95)	48
	7b		48		48		48		48
V-59	8a	R (100)	48	R (100)	48	S (95)	0	S (95)	4
	8b		48		48		0		2
V-38	9a	R (100)	48	S (100)	0	R (100)	48	R (91)	48
	9b		48		0		48		47
IV-52	10a	S (100)	0	S (100)	0	S (100)	0	S (100)	3
	10b		0		0		0		0

JUD: Judicial Judgement by Supranational Reference Laboratory Network

*Inter-laboratory agreement ratio in SRLN is indicated in parenthesis (%).

Labs: Number of laboratories which showed resistant result

S: Susceptible, R: Resistant

Table 3 Performance indicators for each drug tested by laboratory categories

Laboratory	Drug	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)	Reproducibility (%)	kappa [†]
Hospital (n=25)	INH	100.0	98.0 (62.5-100)*	99.2 (85-100)	99.2 (90-100)	0.983
	RFP	97.0 (83.3-100)	100.0	98.2 (90-100)	98.8 (90-100)	0.963
	SM	88.3 (66.7-100)	98.0 (87.5-100)	92.2 (80-100)	96.4 (70-100)	0.841
	EB	99.0 (75-100)	96.3 (75-100)	97.4 (85-100)	96.4 (70-100)	0.946
Private (n=23)	INH	100.0	100.0	100.0	100.0	1.000
	RFP	98.6 (83.3-100)	100.0	99.1 (90-100)	99.1 (90-100)	0.982
	SM	86.6 (66.7-100)	100.0	92.0 (80-100)	98.7 (90-100)	0.838
	EB	100.0	99.6 (91.7-100)	99.8 (95-100)	99.6 (90-100)	0.995

*Range in parenthesis

[†] kappa: kappa coefficient

施設の割合)は85.4%, SMについては77.1%となった。SMの判定についてはX-8249株についても約半数の施設で感受性と判断されており, 一致率は45.8%であった。またV-59株についてEB耐性とした施設が4施設認められた。その他の被験菌についてはすべて95%以上(46施設以上)の一致率を示していた。

(4) 試験法・施設別判定

それぞれの試験法での感度, 特異度, 一致率, 再現性, κ 指数はTable 1のごとくであった。多くの施設で使用されているウエルパックSとビットスペクトル-SRにつ

いて比較すると, ビットスペクトル-SRについてすべての薬剤で感度, 特異度, 一致率, 再現性, κ 指数とも低い傾向が認められた。全体に成績の低いSMについてみると, ウエルパックSの κ 指数のみ0.9を超えていた。

施設別(病院検査室および検査センター)の結果はTable 3のごとくであった。Fig.には施設別のばらつきと, 各評価指標で90%以下を示す施設の割合を示した。検査センターではINHについて全施設で感度・特異度・一致率・再現性のすべてについて100%であったのに対し, 一般検査室では感度90%以下の施設が2施設(8%)

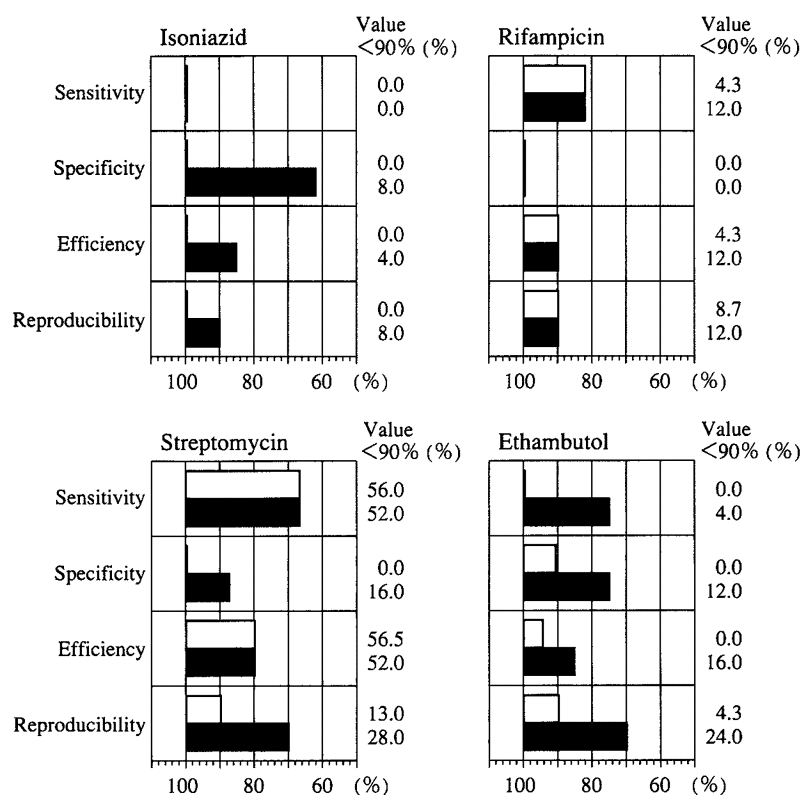


Fig. Range and variety of values by laboratory category

Open bar: private commercial laboratories, Closed bar: hospital laboratories

Table 4 Performance indicators for each drug tested by the number of samples treated yearly

Laboratory	Drug	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)	Reproducibility (%)	kappa [†]
>300/year	INH	100	98.4 (62.5–100)*	99.4 (85.0–100)	99.6 (90–100)	0.987
	RFP	99.0 (83.3–100)	100	99.4 (90.0–100)	99.6 (90–100)	0.987
	SM	89.5 (66.7–100)	99.0 (87.5–100)	93.3 (80.0–100)	98.3 (90–100)	0.864
	EB	99.0 (75.0–100)	98.6 (75–100)	98.7 (85.0–100)	97.5 (70–100)	0.974
≤300/year	INH	100	99.5 (87.5–100)	99.8 (95.0–100)	99.6 (90–100)	0.996
	RFP	96.5 (83.3–100)	100	97.9 (90.0–100)	98.3 (90–100)	0.957
	SM	85.4 (66.7–100)	99.0 (87.5–100)	90.8 (80.0–100)	96.7 (70–100)	0.815
	EB	100	97.2 (75.0–100)	98.3 (85.0–100)	98.3 (90–100)	0.966

*Range in parenthesis

† kappa: kappa coefficient

認められた。同様に RFP では感度が 90% を下回る施設が検査センターで 1 施設 (4.3%)、一般検査室で 3 施設 (12%) 認められている。施設種別での差異は EB で最も大きく、検査センターでは感度・特異度ともに 90% を下回る施設はなかったが、一般検査室では感度 90% 以下の施設が 1 施設 (4%)、特異度 90% 以下の施設が 3 施設 (12%) あり、特に再現性は 6 施設 (24%) が 90% 以下であった。SM に関しては検査センター、一般検査室ともに感度 90% 以下の施設が 50% 以上に認められたが、これは今回使用した耐性菌株のうち 2 株 (X-8249 および IX-5655) を感受性と判定した施設が多かったことによ

る。総合的にみると、一般病院検査室間の検査結果のばらつきは検査センターに比べて大きく、さらにばらつきの範囲が同じであっても、一般検査室の検査精度は検査センターに比べて低い傾向にあった。

(5) 検査数別判定

2003 年度に実施したアンケートの結果をもとに、年間の感受性試験実施件数によって施設を分類した。年間検査実施数 300 件を境として参加施設を 2 群に分けたが、感度・特異度・一致率・再現性・ κ 指数の各指標に差はなかった (Table 4)。また年間 100 検体以下の施設についても、年間 300 件以上の検査を実施している施設の

Table 5 Quality improvement of laboratory performance by on-site evaluation

	Isoniazid (%)		Rifampicin (%)		Streptomycin (%)		Ethambutol (%)	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2003	2004
Laboratory A								
Sensitivity	28.6	100.0	75.0	100.0	66.7	91.7	33.3	100.0
Specificity	100.0	100.0	66.7	100.0	64.3	100.0	71.4	100.0
Efficiency	50.0	100.0	70.0	100.0	65.0	95.0	60.0	100.0
Reproducibility	100.0	100.0	100.0	100.0	90.0	90.0	100.0	100.0
Laboratory B								
Sensitivity	100.0	100.0	62.5	100.0	50.0	100.0	100.0	100.0
Specificity	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	85.7	100.0
Efficiency	100.0	100.0	85.0	100.0	85.0	100.0	90.0	100.0
Reproducibility	100.0	100.0	90.0	100.0	90.0	100.0	100.0	100.0

感度・特異度・一致率・再現性・ κ 指数と比較検討したが、検査精度に有意な差はなかった。

(6) 精度改善

2003年度の外部精度評価で検査精度が不十分と思われた2施設について、現地において検査手順の検討と考えられる原因に関する改善活動を行った。今回の結果はTable 5のように両施設にて改善を示した。

考 察

WHO/IUATLD Stop TB Laboratory Subgroupでは基本的にINHおよびRFPに対して感度、特異度、再現性を95%以上に保つことを基本とし、主要4剤について一致率90%以上を目標としている。今回の参加全施設の平均から見た結果では、INH、RFPおよびEBでこの基準を満たしたものの、SMで感度が基準を下回った。

SMにおける感度は平均87.5%であり、一致率は92.1%であったが、これはパネル内の2種の株X-8249およびIX-5655での判定一致率が低かったことによる。X-8249株についてはSRLNでの判定一致率が90.5% (21施設中19施設で耐性と判定) であり、今回用いた菌株の中ではやや一致率の低い株であった。またIX-5655株についても同様で、SRLNでの一致率は90% (20施設中18施設で耐性と判定) であった。被験菌セット内では同一の2株を1組としてセットを構成しているが、今回の参加施設では、23施設がX-8249株の両方を感受性と判定し、2施設のみどちらか一方を耐性と判定していた。IX-5655株についても同様で、感受性と判定した10施設すべてで再現性があった。

方法ごとにSMの判定不一致の内容を検討すると、ビットスペクトル-SRで78.3% (23施設中18施設)、ウエルパックSで26.7% (15施設中4施設)、1%小川培地で66.7% (3施設中2施設)、MGITで20% (5施設中1施設) で感受性と判定されていた。2003年度には試験法による差は認めなかったが、今回ビットスペクトル-SR

について、ウエルパックSおよびMGITに対して齟齬が多く認められた。またSMの感度については菌液調製法によっても差異が認められているが、目視調製施設群が比濁計使用施設群の精度を上回っており、予想外の結果であった。この点についても、原因の一つとして比濁計による菌液調製を実施した施設群でビットスペクトル-SRが多く使用されていた (比濁計使用群で80.0%使用に対して、目視調製群で26.1%) ことが考えられる。

しかしながら、標準法である1%小川培地でも66.7%の施設がSM感受性と判定していたことを考慮すると、方法 (製品) のみの問題ではないと考えられる。SMの基準濃度については、Löwenstein-Jensen培地における基準濃度である4 $\mu\text{g/ml}$ が1%小川培地では10 $\mu\text{g/ml}$ に相当することから、新検査指針での基準濃度の設定が行われている⁶⁾。SMにおける耐性の過小評価 (低感度) は、2002年に日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員の所属する施設で実施された市販薬剤感受性試験培地の精度評価や、2003年度に実施した検査センターに対する外部精度評価でも認められている傾向である⁷⁾⁸⁾。2002年の日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会報告では、この原因の多くが検査実施者の手技の巧拙にあると考察しているが、今回判定の不一致があったいずれの株においても再現性が高いことから、またSMにおいて感受性株を耐性と判定している場合が少ない (高特異度: 全感受性株376株中耐性判定4株のみ) ことから、技術的な問題だけではなく、基準濃度の設定あるいは使用している方法 (製品) の問題ではないかと考えられた⁹⁾¹⁰⁾。

IX-5655株についてはRFPでも9施設で耐性菌を感受性と判定していたが、これはSRLNでは100%の施設間一致を認めた菌株であった。不一致のあった9施設のうち6施設は1組のうちどちらかを耐性と判定しており、これは手技的・技術的な問題と考えられた。

2003年度のPanel testingで特異度に問題があったEBについては今回判定の不一致はほとんど認められなかつ

た。これは今回の菌株を選択するにあたって2003年度よりもSRLN施設間一致率の高い株を選定した結果と考えられる。しかしながら、今回48施設で試験された感受性株576株について、偽耐性と判定された例は12 (2.1%)あり、全耐性株383株中偽感受性と判定された例が2 (0.5%)であったことに比べて、感受性株を耐性と判定する場合が多かったことが示されている。これは2002年度、2003年度の外部精度評価でもみられた傾向であり、「過大評価」と考えられる⁷⁾⁸⁾。もともとEBは静菌的な薬剤であることから感受性試験結果の安定性に問題がいわれているが、この試験結果については、SM同様基礎培地の違いと設定薬剤濃度 (L-Jでは2.0 $\mu\text{g/ml}$, 1%小川では2.5 $\mu\text{g/ml}$) が関連していることが考えられた。

施設分類別 (病院検査室群および検査センター群) の結果では、指標平均値には両者間に差は認められなかったが、病院検査室間に精度のばらつきが大きく、ばらつきの範囲内の精度の低いほうに偏った分布を示していた。この原因は明確でなく、実施件数別にみた精度からは特に件数が少ないことによる精度の低下はみられておらず、検査経験に原因を求めることはできなかった。一般的に病院検査室の日常業務中に20株もの結核菌の薬剤感受性試験を実施することは困難であり、今回の試験も時間的な制約の中で実施されたものと考えられる。Panel testingは日常の検査状況ではなく、その技術者の最大能力を評価すると言われているが、今回病院検査室については最大能力よりも日常程度の能力が反映されている可能性がある。病院検査室と検査センターで日常の業務に量的・質的な差があるかどうかは不明であるが、今後のPanel testingにおいては、テストにかけている時間・コストおよび労力についても同時に調査して検討評価しなければ結果の公平性や信憑性を欠く恐れがある。

今回の解析では新たな指標として κ 指標を導入した。これは判定の一致の程度を示す指標の一つであり、偶然の一致以上に結果が一致しているかどうかを判定するのに有用である。Landisらによると $0 \leq \kappa \leq 0.2$ はごく軽度の一致、 $0.2 \leq \kappa \leq 0.4$ は軽度の一致、 $0.4 \leq \kappa \leq 0.6$ は中等度の一致、 $0.6 \leq \kappa \leq 0.8$ は高度の一致、 $\kappa > 0.8$ はほぼ完全な一致とされる¹¹⁾。 κ 指数を用いることにより、差異の原因は別として、感度・特異度の数値からは一見してわかりにくい全体の差異が明瞭になったと思われる。

検査精度改善のための活動の一環として、INHおよびRFPについて結果の不一致が多く認められた施設について現地で担当者と原因を検討したところ、一つの原因として菌液調製の段階での問題が考えられたことを報告した⁹⁾。これはすべての菌株の発育速度が同一でないため、全菌株について同一の培養時間では十分に増殖していな

い菌株があり、菌液の濃度が不十分であったにもかかわらずこれがそのまま接種されて判定されていたもので、100倍希釈発育コントロールに十分な発育が見られないというものであった。この点について現地で改善を検討した2施設については今回著明な改善を認めており、Panel testingに基づく精度改善活動の有用性を示しているものと考ええる。

薬剤感受性試験を含む抗酸菌検査の精度保証については、世界的にその重要性が認識されており、特に外部からの精度評価による検査精度の確保が進められている。米国では既に1992年にCenters for Medicare & Medicaid Services (CMS) がClinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) に基づいていくつかの組織 (実施機関) を認証し、それらの組織が実施する精度保証プログラムに参加することを義務づけている¹²⁾。プログラムの内容は各検査施設の実施検査内容によって異なるが、抗酸菌検査に関しては年に2回実施され、内部精度管理内容からPanel testing (塗抹・同定・感受性)、管理者の資格に至るまで細かに調査される。検査施設はこのプログラムに合格することにより認証を受けることができ、この認証は2年ごとに更新の必要がある。世界的にはWHO主導で抗酸菌塗抹検査の外部精度評価 (検体の再検査・Panel testing・訓練) が推進されており¹³⁾、ベトナム、フィリピン、モンゴル等90%以上の施設に検体の再検査による外部精度評価を実施している国もある。このように現在外部精度評価は途上国においてすら重要なキーワードであり、今後は塗抹検査だけでなく培養にも拡充される予定である。薬剤感受性試験の外部精度評価だけではなく、今後は日本においても塗抹・培養・同定・核酸増幅法に関連した外部精度評価を実施していく必要がある。

謝 辞

この研究は2004年度厚生労働科学研究補助金・新興再興感染症研究事業「小児結核及び多剤耐性結核の予防、診断、治療における技術開発に関する研究」から研究費の補助を受けて実施された。

※日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会

委員長：高嶋哲也 副委員長：小栗豊子 委員：一山 智、小川賢二、鎌田有珠、古賀宏延、塩谷隆信、竹山博泰、御手洗聡、和田光一、斎藤 肇、富岡治明、土井教生、長沢光章、樋口武史 協力：阿部千代治

文 献

- 1) World Health Organization: Guidelines for establishing DOTS-PLUS pilot projects for the management of multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva: WHO.

- 2000.
- 2) World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis surveillance. Geneva, Switzerland, 1997. WHO/TB/97. 229.
 - 3) Laszlo A, Rahman M, Espinal M, et al.: WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6: 748–756.
 - 4) 御手洗聡: 結核菌とくに薬剤感受性検査の精度管理に関する研究. 小児結核及び多剤耐性結核の予防, 診断, 治療における技術開発に関する研究: 平成15年度総括・分担研究報告書. 2004: 164–185.
 - 5) Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, et al.: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997; 1: 231–238.
 - 6) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 抗酸菌検査の精度管理 (1) 市販培地の発育試験成績について. 結核. 2003; 78: 61–64.
 - 7) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 抗酸菌検査の精度管理 (2) 市販薬剤感受性試験培地の精度について. 結核. 2003; 78: 563–568.
 - 8) 御手洗聡 (日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会): 検査センターを対象とした結核菌薬剤感受性試験外部精度アセスメント. 結核. 2005; 80: 349–358.
 - 9) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「新結核菌検査指針」: 第8章 精度管理. 結核予防会, 東京, 2000.
 - 10) Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al.: Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ.* 1969; 41: 21–43.
 - 11) Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33: 159–177.
 - 12) Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA): Available from: URL: <http://www.cms.hhs.gov/clia/01>
 - 13) Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, et al.: External quality assessment for AFB smear microscopy. Association for public health laboratories. 2002, 1–111.

Original Article

EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT OF DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING
FOR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Satoshi MITARAI

The Committee for Mycobacterial Examinations, The Japanese Society for Tuberculosis

Abstract [Objective] The Committee for Mycobacterial Examinations has planned and implemented the third external quality assessment of drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* to the hospital and private laboratories.

[Method] The Committee delivered 20 *M. tuberculosis* strains, exactly pairs of 10 strains, which were evaluated and standardized for the drug resistance pattern in the WHO/IUATLD supra-national laboratory network (SRLN). The agreement of the majority of SRLN laboratories was considered as the gold standard of susceptibility result for each strain tested. Each laboratory performed the drug susceptibility testing (DST) with its own routine method. The sensitivity to detect drug resistance, the specificity for susceptible strain, the efficiency of overall agreement, the reproducibility for each pair, and kappa coefficient were calculated to evaluate their performance. DST was performed for isoniazid (INH), rifampicin (RFP), streptomycin (SM) and ethambutol (EB).

[Results] A total of 48 results has been collected. The overall sensitivity, specificity, efficiency, reproducibility and kappa coefficient for each anti-tuberculosis drug tested were as follows respectively; 100%, 99.0% (62.5–100), 99.6% (85.0–100), 99.6% (90–100) and 0.991 for INH; 97.7% (83.3–100), 100%, 98.6% (90–100), 99.0% (90–100) and 0.972 for RFP; 87.5% (66.7–100), 99.0% (87.5–100), 92.1% (80–100), 97.5% (70–100) and 0.84 for SM; 99.5% (75.0–100), 97.9% (75.0–100), 98.5% (85.0–100), 97.9% (70–100) and 0.97 for EB. Regarding private laboratories, all indicators showed 100% for INH but 2 hospital laboratories showed less than 90% in sensitivity. As for RFP, one private laboratory (4.3%) and 3 hospital laboratories showed less than 90% in sensitivity. The major difference between private and hospital laboratories was seen in EB. One hospital laboratory (4.0%) showed less than 90% in sensitivity and three (12.0%) showed less than 90% in specificity, compared to none in private laboratories. Additionally, six hospital labora-

tories (24.0%) showed less than 90% in reproducibility. As for quality improvement, two private laboratories that showed poor performance in 2003 have improved their quality up to 100% in 2004.

[Discussion] The overall efficiency by private and hospital laboratories satisfied WHO criteria. However, it diverged in each category of laboratories and hospital laboratories tended to show poor performance compared to the private ones. The reason for the difference was not clear, but the routine workload, allocated time and cost for the panel testing might contribute to it. The sensitivity of SM was relatively low compared to the other drugs as it was observed in 2003. It was mainly due to two strains to which the participating laboratories showed poor agreement to the gold standard. The difference of critical drug concentration for SM in Löwenstein-Jensen and in 1% Ogawa medium might contribute to the discrepancies. As for quality improvement, two private laboratories with poor performance in 2003 have shown marked improvement after on-site evaluation. The results indicated the usefulness of external quality assessment for the maintenance and improvement of the quality of the test.

Key words: Tuberculosis, Drug susceptibility testing, Private laboratory, Hospital laboratory, External quality assessment

Bacteriology Division, *Mycobacterium* Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association (JATA)

Correspondence to: Satoshi Mitarai, Bacteriology Division, *Mycobacterium* Reference Centre, Research Institute of Tuberculosis, JATA, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: mitarai@jata.or.jp)